

15. Chattoo B. B., Palmer E., Ono B.-I., Sherman F. Patterns of genetic and phenotypic suppression of *lys2* mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* — Genetics, 1979, vol. 93, N 1, p. 67—80.
16. Eibel H., Philippsen P. Identification of the cloned *Saccharomyces cerevisiae* *LYS2* gene by an integrative transformation approach. — Molecular and General Genetics, 1983, vol. 191, N 1, p. 66—73.
17. Fabre F. Induced intragenic recombination in yeast can occur during the G1 mitotic phase. — Nature, vol. 272, p. 795—798, 1978.
18. Fink G. R. A cluster of genes controlling three enzymes in histidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — Genetics, 1966, vol. 53, p. 445—459.
19. Fink G. R., Styles C. A. Gene conversion of deletions in the *HIS4* region of yeast. — Genetics, 1974, vol. 77, p. 231—244.
20. Hurst D. D., Fogel S. Mitotic recombination and heteroallelic repair in *Saccharomyces cerevisiae*. — Genetics, 1965, vol. 50, p. 435—458.
21. Lawrence C. W., Sherman F., Jackson M., Gilmore R. A. Mapping and gene conversion studies with the structural gene for iso-1-cytochrome c in yeast. — Genetics, 1975, vol. 81, N 4, p. 615—629.
22. Manney T. R., Mortimer R. K. Allelic mapping in yeast by X-ray induced mitotic conversion. — Science, 1964, vol. 143, p. 581—583.
23. Moore C. W., Sherman F. Role of DNA sequences in genetic recombination in the iso-1-cytochrome c of yeast. I. Discrepancies between physical distances and genetic distances determined by five mapping procedures. — Genetics, 1975, vol. 79, p. 397—418.
24. Mortimer R. K., Schild D. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*. — Microbiological Reviews, 1980, vol. 44, N 4, p. 519—571.
25. Rose A. H. Growth and handling of yeast. — Methods in Cell Biology, 1975, vol. 12, p. 1—16.
26. Sherman F., Jackson M., Liebman S. W. et al. A deletion map of *cycl* mutants and its correspondence to mutationally altered iso-1-cytochrome c of yeast. — Genetics, 1975, vol. 81, p. 51—73.
27. Wildenberg J. The relation of mitotic recombination to DNA replication in yeast pedigrees. — Genetics, 1970, vol. 66, p. 291—304.

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МУТАНТОВ ХЛАМИДОМОНАДЫ, НАКАПЛИВАЮЩИХ ПРОТОПОРФИРИН IX

Е. М. ЧЕКУНОВА, К. В. КВИТКО

В настоящее время усилия многих биологов направлены на создание штаммов-продуцентов биологически активных веществ, используемых в медицине, сельском хозяйстве и промышленности. К таким веществам несомненно относятся порфирины. Порфирины — окрашенные тетрапиррольные соединения; в комплексе с металлами они широко распространены в природе — это гемоглобин, хлорофилл и его предшественники, витамин  $B_{12}$ , ферменты: каталазы, пероксидазы, цитохромы. В один класс с порфинами крови и зеленого листа входят синтетические красители ряда фталоцианинов, применяемые в промышленности.

Протопорфирин IX является общим предшественником гема и хлорофилла. Его металлопроизводные широко используются в органических и фотохимических исследованиях, а также в качестве катализаторов химической промышленности. Таким образом, с одной стороны существует практическая потребность в значительных количествах протопорфирина IX, а с другой — принципиальная возможность получения этого вещества в результате жизнедеятельности различных живых существ. Так, известны мутанты кишечной палочки [12], дрожжей [18] и фотосинтезирующих организмов: водорослей [15, 23] и высших растений [26], накапливающих протопорфирин.

У одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* мутанты, накапливающие протопорфирин, были получены и описаны многими исследователями [20], [6], [15, 23] и [2, 10, 21]. Накопление порфириновых пигментов — результат блока в синтезе хлорофилла.

Применение генетических методов при изучении этих мутантов позволило выявить гены, детерминирующие отдельные этапы биосинтеза хлорофилла (рис. 1), и показать, что накопление протопорфирина обуслов-

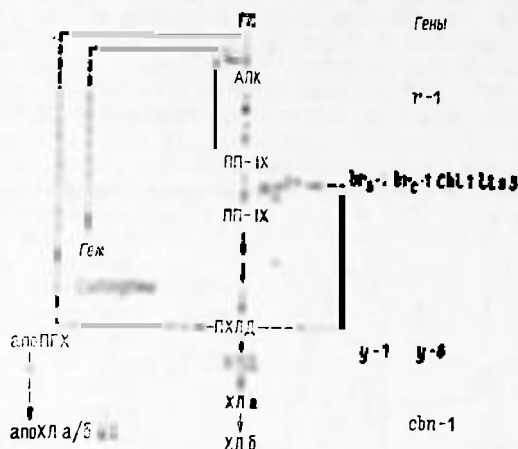


Рис. 1. Схема биосинтеза гема и хлорофилла у хламидомонады [по].

Справа на схеме перечислены мутации, затрагивающие соответствующие этапы пути биосинтеза хлорофилла: АЛК — 6-аминодевулиновая кислота, ПХЛД — протохлорофиллид, ХЛД — хлорофиллид; ХЛ а/б БК — хлорофилл а/б белковый комплекс, ПП-IX — протопорфирин IX; Гл — глутамат.

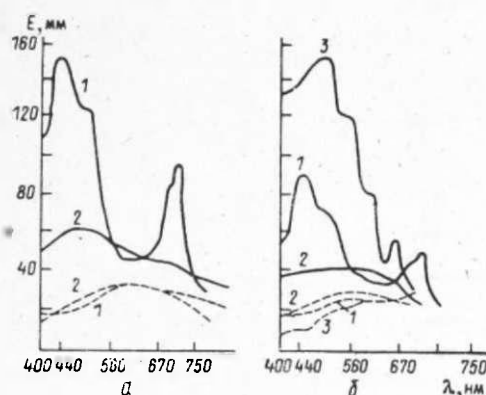
лено нарушением процесса встраивания магния в молекулу протопорфирина IX. Коллекция таких мутантов создана в лаборатории генетики микроорганизмов Биолог. НИИ ЛГУ. Их изучение позволило идентифицировать мутации *chl1* и *lts3* [7], *or3*, *or13* [2], *or2/5* [10] и показать моногенный характер их наследования через оба типа спаривания [1, 7], а также было выяснено, что у штамма H19 из этой коллекции интенсивное накопление порфирина обусловлено взаимодействием двух мутаций *chl1* и *mod19* [3]. Для этого штамма продемонстрирован принципиальная возможность получения значительных количеств протопорфирина [8] при его культивировании. Исследование аналогичных светочувствительных, накапливающих протопорфирин мутантов хламидомонады позволило В. Т. Вангу [15, 23] выявить несколько ядерных генов *brs-1*, *brs-2*, *brs-1* и *grc-1*, мутации в которых приводят к накоплению пигмента. Несомненная практическая значимость таких мутантов привела нас к необходимости их дальнейшего генетического изучения.

**Материалы и методы.** В работе были использованы штаммы *Chl. reinhardtii* из Петергофской генетической коллекции водорослей [5] и их рекомбинанты, полученные в ходе работы. Тест на комплементацию проводили методом микроспектрофотометрирования гамет и молодых зигот, разработанным для хламидомонады [1, 11], на приборе МУФ-5. Для количественной оценки содержания хлорофиллов использовали величину  $K = \frac{E_{440}}{E_{560}}$ , где значение экстинкции, характеризующее накопление хлорофиллов ( $E_{440}$ ), отнесено к  $E_{560}$ , которая служит мерой светорассеяния. Скрещивания и тетрадный анализ осуществляли по методике, описанной А. В. Столбовой [по 4]. Использовали следующие химические мутагены: N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ), 2-амино-6N-гидроксиминопурин (АГАП) и диэпоксиоктан (ДЭО). Оценку частоты ревертирования проводили в спот-тесте по методу

Айера и Шибальского, внося вещества на дисках фильтровальной бумаги в центр чашки Петри, на которую предварительно наносили суспензии клеток в концентрации  $10^7$  клеток в миллилитре репликатором упорядоченного посева. Частоту ревертирования оценивали по формуле  $\alpha = P/M$ , где  $P$  — число появившихся клонов ревертантов, а  $M$  — количество клеток мутанта. В работе использовали следующие стандартные количества мутагенов, наносимых на чашку с культурой клеток: МННГ — 10 мкг, ДЭО — 1 мкл, АГАП — 20 мкл 1%-ного раствора.

**Результаты.** Для генетического анализа мутантов (выявления аллельных взаимоотношений) применяли два традиционных теста: комплементационный и рекомбинационный.

Комплементацию изучали методом микроспектрофотометрирования



2. Микроспектрофотометрия отдельных молодых зигот и гамет.

а: 1 — зигота дикого типа, 2 — гомозигота по мутации *or* 13, б: 1 — гамета дикого типа, 2 — мутантная гамета (*chl* 1—19), 3 — спектр крупного скопления протопорфирина IX. Пунктиром дано фоновое поглощение.

молодых одно-двухдневных зигот, который позволяет получить контрастную характеристику отдельного фенотипа — хлоропласта (рис. 2). Хлоропласты мутантных гамет и зигот характеризуются резким уменьшением оптической плотности в полосе 440 нм, соответствующей поглощению хлорофилла *a* *in vivo* по сравнению с диким типом. Включения накопленного мутантами порфирина имеют пики, характерные для протопорфирина IX [13]. Количественная оценка содержания хлорофиллов (К) для зигот с различными сочетаниями мутаций бес-

хлорофильности, а также для их гомо- и гетерозигот представлены в табл. 1. Для зигот дикого типа и гетерозигот значения К составляют 8,7 и более и у них нет протопорфирина, а для мутантных гамет и гомозигот К не превышает 3, при этом в клетках появляется протопорфирин IX в виде крупных скоплений. Уменьшение значений К достоверны ( $t_{\text{крит}} = 9,5$ , и  $P_0 < 0,005$ ).

Таблица 1. Комплементация мутаций бесхлорофильности

Генотипы родителей	Относительное поглощение света хлорофиллом К = $\frac{E_{440}}{E_{680}}$ у гамет и зигот						
	<i>or</i> 13	<i>its</i> 3—122	<i>chl</i> 1—19	<i>chl</i> 1—19	<i>or</i> 2,5	Дикий тип	Гаметы
<i>or</i> 13	3,0	2,9	8,9	8,9	9,3	8,7	2,3
<i>its</i> 3—122	—	—	9,0	8,9	—	8,8	2,0
<i>chl</i> 1—19	—	—	1,1	1,3	1,1	8,9	1,1
<i>or</i> 3	—	—	—	1,7	1,8	9,3	1,7
<i>or</i> 2,5	—	—	—	—	—	10,1	1,2
Дикий тип	—	—	—	—	—	8,7	7,8

Восстановление фенотипа дикого типа у гетерозигот позволило нам сделать заключение о рецессивности мутаций, приводящих к накоплению протопорфирина IX. Качественная оценка характера взаимодейст-

вия мутантных аллелей отражена в табл. 2. Все изучаемые мутации распределились по двум группам комплементации: в первую — входят мутантные аллели *lts3-122* и *or13*, во вторую — *chl1-19*, *or2/5* и *or3*. Таким образом, нарушение синтеза хлорофилла, приводящее к накоплению порфирина, обусловлено мутационными повреждениями в двух генетических локусах *chl1* и *lts3*. Мутанты по этим генам имеют фенотипические различия. Так, *chl1*-мутанты практически не имеют хлорофилла, тогда как мутация в гене *lts3* обуславливает способность к накоплению некоторого количества хлорофилла при росте на слабом свете.

Таблица 2. Результаты комплементационного и рекомбинационного тестов

Мутации	<i>or13</i>	<i>lts3-122</i>	<i>chl1-19</i>	<i>or3</i>	<i>or2/5</i>	<i>brs-1</i>	Дикий тип
<i>or13</i>	—	—	+	+	+	+	+
			18,4%	41,0%	44,2%	43,5%	
<i>lts3-122</i>		—	+	+	+	+	+
			23,5%	31,5%	32,4%		
<i>chl1-19</i>			< $1,5 \cdot 10^{-4}$	< $3,9 \cdot 10^{-4}$	< $1,8 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	+
<i>or3</i>				< $1,4 \cdot 10^{-4}$	< $1,1 \cdot 10^{-4}$	—	+
<i>or2/5</i>							+
<i>brs-1</i>	< $1,5 \cdot 10^{-4}$						

Примечание. «—» — означает отсутствие, а «+» — наличие комплементации. В скобках — частоты рекомбинации.

Рекомбинационный анализ показал, что мутации, принадлежащие к разным группам комплементации, рекомбинируют свободно, т. е. не сцеплены между собой (табл. 2). Кроме того, вовлечение в рекомбинационный анализ мутантов *brs-1* и *brs-1* показало отсутствие рекомбинации в зиготах *brs/chl1* (частота рекомбинации меньше  $1,2 \cdot 10^{-4}$ ) и *brs/lts3* (частота рекомбинации меньше  $1,5 \cdot 10^{-4}$ ), и свободную рекомбинацию при сочетании *brs/lts3* (частота рекомбинации 43,5%).

Тетрадный анализ подтвердил описанный ранее моногенный характер наследования обеих мутаций [2, 7]. Для их картирования мы скрещивали мутанты, накапливающие протопорфирин и их рекомбинанты с множественно-маркированными линиями хламидомонады. Результаты тетрадного анализа (табл. 3) свидетельствуют об отсутствии сцепления

Таблица 3. Тетрадный анализ *lts2*- и *chl1*-мутантов

Мутации, группа сцепления и расстояние от центромера	<i>lts3</i>	$\chi^2$	<i>chl1</i>	$\chi^2$
<i>msr-1</i> , I [43]	9 : 3 : 13	6,80	5 : 11 : 27	2,25
<i>act2</i> , VI [44]	7 : 3 : 17	1,94	25 : 12 : 43 (56 cM)	12,30
<i>mt</i> , VI [37]	8 : 9 : 16	5,6)	—	—
<i>ntc13</i> , X [8]	3 : 5 : 12	4,00	7 : 9 : 9	11,02
<i>pf2</i> , VI [2]	7 : 7 : 18	1,27	15 : 14 : 41	2,11

Примечание. В таблице даны соотношения тетрад родительского (P), неродительского (N) дитипов и тетратипов (T). В скобках — расстояние в сантиморганах.

мутации *lts3* с маркерами I, VI, X, XI групп сцепления, хотя отсутствие сцепления с маркером *msr-1* (1-я группа сцепления) требует уточнения, к тому же она не сцеплена со своей центромерой. Что касается мутации *chl1*, то она не проявляет сцепления с маркерами I, X и XI хромосом и со своей центромерой. В сочетании с мутацией *act2* VI группы

сцепления  $P > N$  и  $T < 2/3$ , что может быть результатом слабого сцепления (56 сМ) *chl1*-локуса с маркером левого плеча VI хромосомы. Следует отметить, что в мейозе зигот с их участием наблюдается нерегулярное расхождение правого плеча VI хромосомы (локус типа спаривания *mt*), которое выражается в дефиците рецессивного класса — *mt*+. Так, если рассматривать потомство в тетрадном анализе как случайную выборку зооспор, доля зооспор *mt* + составляет лишь 14,5%.

Стабильность мутантных штаммов и природу мутационных нарушений мы предполагали выяснить, изучая ревертирование мутантов к дикому типу под действием различных по специфичности мутагенов: нитрозогуанидина (МННГ), 2-амино-6N-гидроксиламинопурина (АГАП) и диэпоксиктана (ДЭО). МННГ — неспецифичный для хламидомонады супермутаген, АГАП вызывает генные мутации типа замены пар оснований [22], а ДЭО индуцирует хромосомные перестройки у нейроспоры [17] и дрожжей.

Мы отбирали и анализировали темно-зеленые ревертанты, поскольку именно в случае истинно-обратных мутаций следует ожидать полного восстановления синтеза хлорофилла и утраты способности накапливать протопорфирин. Оценка частот появления ревертантов дана в табл. 4. Мы не изучали ревертирование *lts3*-мутантов, поскольку их

Таблица 4. Встречаемость темно-зеленых ревертантов

Шифр исходного штамма	Генотип	Плоидность, n	Частота встречаемости (10 <sup>-8</sup> ) спонтанных ревертантов	Частота возникновения ревертантов (10 <sup>-8</sup> ) индуцированных мутагеном:		
				МННГ	ДЭО	АГАП
784—3	<i>chl1</i> —19	1	< 0,17	13	0	0
783—6	<i>chl1</i> —19	1	5,51	80	0	0
	<i>chl1</i> —19					
Д-19—14	<i>chl1</i> —19	2	< 0,2	0,42	6	0
	<i>chl1</i> —19					
Д-2/5—16	<i>chl1</i> —2, 5	1	< 1,23		0	0
1430—206	<i>chl1</i> —3	1	< 0,48	23	6	0
1430—23а	<i>chl1</i> —3	1	< 0,59	13	0	0
494/3	<i>chl1</i> —3	1	< 1,10	16	0	0

клетки при освещении способны размножаться и при этом накапливать некоторое количество хлорофилла. Данные таблицы демонстрируют, что у штаммов с мутацией в локусе *chl1* частоты встречаемости спонтанных ревертантов варьируют в пределах от 55 до значений, меньших  $1,7 \cdot 10^{-9}$ , что на несколько порядков ниже величины  $10^{-9}$ , описанной для локусов с точковыми генными мутациями. Все штаммы оказались стабильными при размножении, и ревертанты не появлялись при достижении численности  $10^{-9}$  клеток. Исключение составляет гаплоид 783-6, генотипический фон которого, вероятно, благоприятствует проявлению супрессоров. Эти различия гаплоидов 783-6 и 784-3 сохраняются и при индуцированном мутагенезе. Еще более высокой стабильностью обладает диплоид Д-19—14, частота индуцированных ревертантов у него на два порядка ниже чем у гаплоидов. Из трех выбранных мутагенов эффективно индуцирует темно-зеленые ревертанты только один — нитрозогуанидин; частоты индукции составляют для гаплоидов  $13$ — $8 \cdot 10^{-7}$ , а для диплоида —  $4,2 \cdot 10^{-9}$ . Диэпоксиктан оказался эффективным только для одного штамма и при этом обнаружил сильное летальное действие на клетки хламидомонады.

Для выяснения генетической природы ревертантов мы скрещивали их со штаммами дикого типа и анализировали потомство методом семейного анализа (табл. 5). Выщепление сегрегантов, накапливающих протопорфирин, в потомстве от скрещивания двух зеленых культур

указывает, что полное восстановление синтеза хлорофилла обусловлено мутацией в супрессорных генах. Супрессорная мутация не проявляет тесного сцепления с исходной мутацией — частоты появления накапливающих порфирины оранжевых рекомбинантов составляет для диплоид-

Таблица 5. Гибридологический анализ ревертантов

Генотип мутанта, от которого получен ревертант	Генотип второго родителя	Плоидность зигот. в	Встречаемость семей рекомби- нантного фенотипа	
			оранж.	бел. карлики
chl1-19	chl1+	2	23	41
chl1-3	chl1+	2	14,2	0
chl1-19	chl1+	3	0,44	73
chl1-19	chl1+	4	2,42	0

ных зигот 14 и 23%, а в тетраплоидном расщеплении — 2,4%, т. е. не являются внутригенными изменениями. Наряду с оранжевыми мы наблюдали появление белых карликовых колоний в потомстве ревертантов, несущих мутацию chl1 как в гаплоидном, так и диплоидном наборах хромосом, однако их не было при расщеплении дуплекса chl1-19/chl1-19/+ +.

**Обсуждение.** Генетическое изучение бесхлорофильных, накапливающих порфирины мутантов зеленой водоросли хламидомонады представляет интерес как в плане создания с использованием генетических методов высокопродуктивных штаммов-продуцентов порфирина, так и для изучения путей и регуляции биосинтеза хлорофилла и биогенеза хлоропласта. Накопление ограниченных количеств пигментов-предшественников в случае всех бесхлорофильных мутантов хламидомонады [23, 24, 25] позволило предположить [25], что подавление синтеза предшественников осуществляется по принципу обратного ингибирования синтеза исходного субстрата промежуточными продуктами биосинтеза (на рис. 1 пунктиром обозначена обратная связь). В. Т. Ванг с соавт. предполагают, что предшественник хлорофилла — протохлорофиллид — после достижения определенного количественного уровня способен репрессировать синтез  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты ( $\delta$ -АЛК). Были описаны мутации mod-19 [3] и г-1 [24], которые приводят к понижению уровня содержания хлорофилла и уменьшению активности АЛК-синтетазы до 40%. При объединении мутаций г-1 с bgs-1, brc-1, brc-2 и у-1, у двойных мутантов наблюдали увеличение количества протопорфирина примерно в 20 раз по сравнению с исходными мутантами. Такие же результаты получали, объединяя мутации mod-19 с chl-19 и hls3-122 [3]. Аналогичный эффект достигался в обоих случаях и при введении внешней  $\delta$ -АЛК, что снимало лимитирующее действие АЛК-синтетазы [25]. Вероятно, г-1 и аналогичная ей mod-19 — регуляторные ядерные мутации, которые делают АЛК-синтетазу нечувствительной к обратному ингибированию. Именно такая комбинация условий — избыток АЛК и использование штамма Н-19 — двойного мутанта chl1 mod19 позволили получить высокий выход порфирина [8].

В ходе нашей работы было выяснено, что блокирование синтеза хлорофилла на стадии встраивания магния в молекулу протопорфирина IX, приводящее к накоплению этого предшественника, обусловлено

ядерными рецессивными мутациями в двух локусах *chl1* и *lts3*, соответствующих ранее описанным генам *brs-1* и *brc-1*. Мутации обеих групп различаются по своему фенотипическому проявлению. Так, аллельные *brs-1* и *chl1*-мутанты практически не содержат хлорофилла, накапливают протопорфирин IX и гибнут на свету, а *brc-1* и *lts3* — условные мутанты, так как способны зеленеть на слабом свету. Эти результаты подтверждают предположение [23], что превращение протопорфирина IX в магний-протопорфирин IX у хламидомонады осуществляется отдельно на свету и в темноте (рис. 3). Согласно этой гипотезе, *brs(chl)*

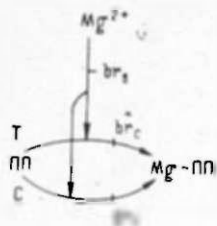


Рис. 3. Модель генетического контроля превращения протопорфирина в Mg-протопорфирин (PP → MgPP).

T — темнота; C — свет.

локус кодирует фактор, существенный для обоих — светового и темного ферментов, например фактор активации магния или нарушение в структуре мембран пластид, которое приводит к нарушению хеляции магния [15]. Ген *brc (lts3)* кодирует темновое превращение протопорфирина IX в магний-протопорфирин IX, а локус *gnc-1* контролирует световую реакцию этого превращения.

Биохимическое изучение белков хлоропластных мембран пигментных мутантов хламидомонады [16] показало, что у штамма H-122 с мутацией в локусе *lts3* блокирован светиндуцированный процессинг белка с молекулярным весом 29,500 светособирающего комплекса, а с мутацией *chl1* авторы связывают отсутствие в тилакоидных мембранах белка 55000 ПБЛК 1.

Механизм внедрения магния в протопорфирин IX пока неизвестен, а фермент магний-протопорфирин-хелатаза не выделен. Однако показано, что фермент проявляет активность *in vitro* только в присутствии интактных пластид [19], т. е. встроен в мембрану. Таким образом, нарушение хеляции магния в результате мутации *chl1*, очевидно, происходит в результате изменения белковой структуры фотосинтетических мембран хлоропласта.

Моногенный характер наследования мутаций, приводящих к накоплению порфирина, подтверждает предположение о ядерном контроле биосинтеза хлорофилла [25].

Отсутствие мутагенного действия АГАП, специфично вызывающего точковые мутации типа замены пар оснований [22], и малые частоты спонтанного ревертирования позволяют предполагать, что мы имеем дело не с точковыми генными мутациями, к тому же нам не удалось обнаружить случаев истинно обратных мутаций. Генетический анализ ревертантов показал, что восстановление пигментов до уровня, присущего дикому типу, обусловлено мутациями в супрессорных генах. Аномалии в расхождении маркера *mt* левого плеча VI группы сцепления, обнаруженные при тетрадном анализе для мутации гена *chl1*, также могут быть истолкованы в пользу предположения о хромосомных перестройках у штаммов — носителей данной мутации. Появление белых карликовых колоний в потомстве *chl1-19*-ревертантов, вероятно, в результате хромосомного дисбаланса также подтверждает это предполо-

жение. Однако хромосомные нарушения в мейозе не являются прямым эффектом мутации в локусе *chl1*, так как для штамма *chl1-3* мы не наблюдали вышепленного белых карликов.

**Выводы.** 1. У хламидомонады нарушение синтеза хлорофилла, приводящее к накоплению протопорфирина IX, обусловлено мутациями в двух генетических локусах: *chl1* и *lts3*, свободно рекомбинирующих между собой. При этом локус *lts3* блокирует темновое превращение протопорфирина IX в магний-протопорфин IX, а *chl1* контролирует этот процесс как в темноте, так и на свету.

2. Штаммы, несущие мутацию *chl1*, демонстрировали высокую стабильность — частота встречаемости спонтанных ревертантов у них ниже величины  $10^{-9}$ . Индукция реверсий нитрозогуанидином позволила выявить, что наибольшей стабильностью обладает диплоидный штамм Д-19-14, его мутабельность на два порядка ниже, чем у гаплоидов. Обнаруженные межштаммовые различия частот спонтанного ревертирования, вероятно, обязаны генотипическому фону рекомбинантов.

3. Генетический анализ ревертантов от *chl1*-мутантов показал, что восстановление синтеза хлорофилла до уровня, присущего дикому типу, обусловлено действием супрессорных мутаций.

### Summary

Protoporphyrin IX (PP IX) is a common precursor in biosynthesis of heme and chlorophylls. It has been applied widely: metalloprotoporphyrin IX derivatives are used as specific pigments in optic and photochemical research, as biocatalysts — in chemical industry.

The mutants of the green algae *Chlamydomonas* with blocks in chlorophyll biosynthesis were studied. The forms were found, which stopped the insertion of magnesium into PP IX. This mutants are able to accumulate PP IX in amounts near to chlorophyll contents in wild type cells. The two loci were found: *chl1* and *lts3* (allelic to *brc1* and *brs1* described by W.-Y. Wang): the first controls light reactions as well as dark ones, the *lts3* mutations are leaky blocks of dark reactions. A regulatory loci *mod19* was able to increase accumulation of PPIX. All three alleles of *chl1* are stable. The reasonable way to get producents is the construction of strains with a combination of *chl1* and *mod19* mutations.

### УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бояджиев П. Х., Смирнов А. Ф., Квитко К. В. Микроспектрофотометрия пигментных мутантов хламидомонады. — В кн.: Управление биосинтезом микроорганизмов. Красноярск, 1973, с. 97—99.
2. Бояджиев П. Х. Цитогенетический анализ пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*: Автореф. канд. дис. Л., 1974.
3. Закова Н. С. Генетическая и ультраструктурная характеристика хлорофильных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*: Автореф. канд. дис. Л., 1981, 18 с.
4. Квитко К. В. Биология и генетика штаммов 137C *Chlamydomonas reinhardtii*. — В кн.: Экспериментальная альгология. Л., 1977, т. 25, с. 75—105.
5. Квитко К. В., Борщевская Т. Н., Чунаев А. С., Тугаринов В. В. Петергофская генетическая коллекция штаммов зеленых водорослей *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*. — В кн.: Культивирование коллекционных штаммов водорослей. Л., 1983, с. 28—57.
6. Стобкова А. В. Генетический анализ пигментных мутаций *Chlamydomonas reinhardtii*. Сообщ. I. Идентификация основных пигментов и описание коллекции пигментных форм. — Генетика, 1971, т. 7, № 9, с. 90—94.
7. Стобкова А. В. Генетический анализ пигментных мутаций *Chlamydomonas reinhardtii*. Сообщ. II. Анализ наследования мутаций бесхлорофильности и светочувствительности в скрещиваниях с диким типом. — Генетика, 1971, т. 7, № 11, с. 123—128.
8. Тугаринов В. В., Чунаев А. С. Разработка основ микробиологического метода получения протопорфирина IX, хоз. договор № 765. Л., 1981, 10 с.
9. Хромов-Борисов Н. Н. Изучение мутагенного действия метоксинамина и 6-N-гидроксиметилаинопурина на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*: Автореф. канд. дис. Л., 1976, 24 с.



10. Чумакова Е. Н. О характере генетической детерминации признака оранжевой окраски колоний *Chlamydomonas reinhardtii*. Дипломная работа. Л., 1976.
11. Чумаев А. С., Мирная О. Н., Семенов Е. П. Методы отбора мутантов хламидомонады с нарушениями биогенеза фотосинтетического аппарата. — В кн.: Тез докл. 1-го Всесоюз. биофиз. съезда. М., 1982.
12. Cox R., Charles H. P. Porphyrin-accumulation mutants of *Escherichia coli* — *J. Bacteriology*, 1973, vol. 113, N 1, p. 122—132.
13. Falk J. E. Porphyrins and metalloporphyrins. Amsterdam, 1964. 380 p.
14. Granick S. Mg-protoporphyrin as a precursor of chlorophyll. — *J. Biol. Chem.* 1948, vol. 172, p. 717—727.
15. Grawford M. S., Wang W., Jonsen K. G. Identification of primary lesion in protoporphyrin accumulation mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1982, vol. 188, p. 1—6.
16. Gyurian I., Nagy K. N., Erdos G., Paless G., Kerasztes A., Kovach P., Szigeli Z. Photosynthetic function and thylakoid membrane polypeptide composition in light-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. — *Photosynth. Res.*, 1982, p. 2—16.
17. Ong T. M., Serres F. I. Mutation induction by difunctional alkylation agents in *Neurospora crassa*. — *Genetics*, 1975, vol. 30, N 3, p. 475—482.
18. Pretlow T. P., Sherman F. Porphyrins and zinc porphyrin in normal and mutant strains of yeast. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, vol. 148, p. 629—644.
19. Richter M. L., Rienits K. G. The synthesis on magnesium protoporphyrin-IX by etiochloroplast membrane preparations. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, vol. 717, p. 255—264.
20. Sager R. Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin-resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. — *R.N.A.S.*, 1954, vol. 40, N 5, p. 356.
21. Spreitzer R. J., Mets L. Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotype. — *Plant Physiology*, 1981, vol. 67, p. 565—569.
22. Sorenson W. G., Simpson I.-R., Ong T. M. Comparison of mutagenic and recombinogenic effects of some adenine analogues in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Mutat. Res.*, 1981, vol. 82, p. 95—100.
23. Wang W., Boynton J. I., Gillham N. W. Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas*: analysis of mutant at two loci mediating the conversion of protoporphyrin IX to magnesium-protoporphyrin. — *J. Cell. Biol.*, 1974, vol. 63, p. 806—823.
24. Wang W., Boynton J. I., Gillham N. W. Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas*: analysis of mutant affecting synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid. — *Cell*, 1975, vol. 6, p. 75—84.
25. Wang W. Genetic control of chlorophyll biosynthesis. — *Molec. Gen. Genet.*, 1977, vol. 152, p. 7—12.
26. Wang W. Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. — In: International review of cytology. New York; London, 1978, suppl. 8, p. 335—354.
27. Wettstein D., Kahn A., Nielsen O. F., Gough S. T. Genetic regulation of chlorophyll synthesis analysed with mutants in barley. — *Science*, 1974, vol. 184, p. 800—802.